Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng
Vol. 11, No. 3, 223–231(1983)

*Bacillus thuringiensis*을 이용한 미생물 살충제에 관한 연구

李炯煥 · 金基湘
건국대학교 생물학과 분자미생물학교실
(1983년 8월 25일 수리)

Basic Studies on the Development of a Microbial Pesticide *Bacillus thuringiensis*

Hyung-Hoan Lee, and Ki-Sang Kim,
Molecular Microbiology Laboratory
Department of Biology, Kon Kuk University, Seoul 133
(Received August 25, 1983)

The productions of beta-exotoxin from sixteen *Bacilus thuringiensis strains were examined by Micrococcus flava* primarily, and then measured by spectrophotometer during culturing in Conner and Hansen mineral salts medium at 28°C. Also the toxic effects of the toxin to mice were checked.

The growth of *Bacillus thuringiensis* K2 and BTK2-T1, -T13, -T33 and -T40 got into stationary phase at 6 hour culture and then maintained it up to 48 hours without severe fluctuation. The production of beta-exotoxin from the strains, BTK2, BTK2-T1, -T13, -T17 and -T33 appeared at 6 hour culture and the amounts of the toxin were about 40 μg/ml at 6 hour culture, approximately 70 μg/ml at 12 hours, approximately 85 μg/ml from 24 hours to 48 hours. At 48 hour-culture, BTK2 produced 80 μg/ml of beta-exotoxin (5.5 x 10^8 cells/ml, BTK2-T13 produced 84 μg/ml (4.3 x 10^8 cells/ml), BTK2-T17 produced 87 μg/ml (1.4 x 10^8 cells/ml), and BTK2-T33 produced 84 μg/ml (4.9 x 10^8 cells/ml).

All other serotypes also produced beta-exotoxin. At 48 hour culture, BTK-37 produced 88 μg/ml (6.1 x 10^8 cells/ml), BTK-35 produced 81 μg/ml), and the rest of them produced less than 70 μg/ml.

To check the toxicity of bela-exotoxin and *B. thuringiensis*, the cultured media with microorganisms were inoculated to mice by per os, intraperiloneal, subcutaneous and intracerebral injection, and nasal cavity inoculation for 30 days. However, the toxin did not kill all of the treated mice.

Bacillus thuringiensis 균주는 편모를 갖인 Gram 양성의 호기성균이며 성장중에 β-exotoxin 과 endotoxin을 생산한다. β-exotoxin은 120℃에서 15분간 처리하여도 활성이 변하지 않고, *Galleria mellonella* 유충에 주입해서 독성이 있는 것을 MacConell and Richards[1]가 처음 보고했고, Burgerjon and de Barjac[2]은 이 toxin을 유충의 구강을 통해 먹여도 활성이 있는 것을 관찰했고, 이와 유사한 결과를 Hall and Arakawa[3] 그리고 Dunn[4]도 보고한 바 있다. β-exotoxin이 뉴클레오티드의 성격을 갖인것을 de Barjac and Dedonder[5]와 Benz[6]는 발견했으며, Farks et al.[7]은 그것의 구조식을 밝히었는데 ATP와 유사한 것을 알았다. β-exotoxin은 곤충의 Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera, Coleoptera, Orthoptera, Hemiptera, Isoptera와 Nematodes에 강한 독성을 나타내며[8], 그 외에 Mites에도 작용하는 것을 Krieg[9]와 Hall et al.[10]이 보고했다.

*B. thuringiensis*에서 분비되는 β-exotoxin은 여러 곤충에 독성을 나타내므로 미생물 살충제로서의 역가가 매우 높으며, 척추동물이나 생태계에 나쁜 영향을 전혀 주지 않고 살충제로 유용하다.

*B. thuringiensis*는 flagella 항원에 따라서 여러 혈청형으로 나누는데, 이들이 모두 β-exotoxin을 생산하는 지를 조사했으며, 돌연변이체를 유도하여 β-exotoxin의 생산능을 조사하고, toxin의

안정성을 조사한 것을 보고한다.

실험재료 및 방법

사용한 균주

본 연구실에 보관중인 다음 균주를 실험에 사용했다(Dr. de Barjac 기증).

Bacillus	var. thuringiensis	S1 K－1
thuringiensis	var. thuringiensis	S1 K－2
	var. finitimus	S2 K－27
	var. kurstaki	3ab K－28
	var. galleriae	4ab K－30
	var. subtoxicus	S6 K－31
	var. aizawai	S7 K－32
	var. morrisoni	S8 K－33
	var. tolworth	S9 K－34
	var. darmstudiensis	S10 K－35
	var. toumanoffi	S11 K－36
	var. thompsoni	S12 K－37

*Bacillus thuringiensis*을 BT로 줄여서 표기했다.

Micrococcus flava K－200

배 지

1) Nutrient broth, Nutrient agar, Muller-Hinton broth and agar(DIFCO) 배지를 멸균하여 각종 실험에 이용했다.

2) *B. thuriengiensis*의 β-exotoxin 생산능 검사를 위하여 Conner and Hansen(CH) 액체배지 성분을 변경하여 사용하였다. 그 조성은 다음과 같다. KH_2PO_4 0.5%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.005%, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.003%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001%, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.003%, $Na(NH_4)HPO_4 \cdot 4H_2O$ 0.15%, glucose 1.0%, Casamino acid 1.0%를 증류수에 용해한 다음 pH7.0에 맞춘 후 121℃ 15 lb에서 멸균하여 사용하였다. 이때 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnSO_4 \cdot H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$는 각각 멸균된 증류수에 용해시켜 0.45μm의 milipore filter(sartius)로 여과한 다음 사용하였고, glucose와 casamino acid는 각각 증류수에 용해시켜 가압 멸균하여 첨가하였다.

돌연변이 유발물질

N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(NTG;Aldrich Chemicals)을 증류수에 용해시켜 사용하였다.

표준 탁도액

100 ml의 Volumetric 플라스크에 0.36N H_2SO_4 99.5ml를 넣고 0.048ml $BaCl_2$ 0.5ml를 충분히 용해시켜 접종균 부유액과 동일한 시험관에 넣어 사용하였다.[13]

흰쥐의 혈통 및 사육방법

실험에 사용된 흰쥐는 국립가축위생연구소로 부터 분양받은 ICR계이며 암수 구별없이 체중 10～12g의 것을 사용하였고, 10마리씩 군을 지어 플라스틱제 사육상(280×210×200mm)에서 사육하였다.

흑염소 신장배양세포 및 세포배양액

세포독성 실험에 사용된 흑염소 신장배양세포(Black Goat Kideny Cell)는 국립 가축 위생연구소에서 분양받았다. 세포배양액은 Hank's Salt Solution을 사용하였다.

돌연변이 균주의 분리

한천영양배지에 보존된 BTK2 균주를 실온에 30분간 방치한 다음 50ml 삼각플라스크에 10ml의 Nutrient Broth(NB)를 넣고 2백금이를 접종시켜 28℃ 항온기에서 12시간 배양시킨 다음 새로운 NB 9ml를 첨가하여 자석교반기(대한과학)로 2시간 동안 진탕배양한 후, 200μg/ml의 NTG를 첨가하고 30분 동안 진탕배양한 다음 원심분리기(제일 이화학기 제작소)로 3,000rpm에서 30분간 원심분리하여 얻은 pellet을 동량의 NB로부유시킨 다음, 다시 2회 원심분리하여 잔여 NTG를 제거하였다. 이때 생성된 Pellet을 5ml의 NB로 재부유하여 시험관혼합기(제일이화학기기제작소)로 NB가 담겨있는 시험관에서 10배씩 단계적으로 희석한 후, 적정희석비율에서 *M, flava*를 면봉으로 균일하게 도말한 한천평판배지 표면에 0.1ml의 균액을 떨어뜨리고 "ㄱ"자 유리봉으로 재차 도말하고, 28℃ 항온기에서 18시간 배양한 후 나타난 집락중 *M, flava*에 대한 발육억제대를 크게 형성한 집락을 선택하여 다시 *M, flava*로 도말한 한천평판배지 표면에 가는 나무침으로 선택한 집락을 균일한 크기로 접균하여 28℃ 항온기에서 24시간 배양한 후, 측정하여 정상형과 비교하여 집락의 형태가 다르거나 발육 억제대를 크게 형성한 균주를 돌연변이 주로 판정하고 수 세대 확인하였다.

성장곡선의 비교

250ml의 삼각플라스크에 Conner-Hansen(CH) 액체배지 20ml에 넣고 각 균주를 10루프씩 접종하고, 28℃에서 Rotary Environmental Shaker (Environ-Shaker 3597, Lab-Line Instiuments.

Inc.)로 200rpm으로 8시간 배양한 후 새로운 CH액체배지 20mℓ에 균배양액을 0.4mℓ씩 접종하고 시험관혼합기로 균일하게 섞어 즉시 Spectrophotometer (Spectromic20, Bausch & Lomb)로 540nm에서 흡광도를 측정한 다음, 매시간 마다 흡광도의 변이를 측정하였다.

생균수 측정

시험관(20×180mm)에 CH액체배지 3mℓ을 넣고 각각의 균주를 3루프씩 접종시켜 28℃ Rotary Environmental Shaker에서 200rpm으로 8시간 배양 후, 각각 250mℓ 삼각플라스크에 CH 액체배지 100mℓ 넣고 균배양액 2mℓ을 접균한 즉시 배양을 시작했다.

각 시간마다 0.1mℓ을 취해 0.9mℓ의 CH액체배지가 담긴 시험관(10×90nm)에 넣고 시험관 혼합기로 균일하게 섞어 같은 조건의 시험관으로 적당한 희석배율에서 0.1mℓ을 취하여 한천평판배지 위에 떨어뜨린 다음 "ㄱ"자 유리봉으로 고르게 도말하고, 28℃에 배양한 후 집락수를 시간에 따라 계산했다.

β-exotoxin의 생산 조사

생균수 측정에 사용된 균액에서 6, 12, 24, 36, 48시간 별로 10mℓ씩 취하여 소형원심 분리기 (Hettich D-7200)로 4,000rpm에서 30분간 원심분리하여 Pellets은 버리고 상층액만 취한 다음, Spectro-photometer (Schimadzu UV-240)로 200nm에서 300nm 사이를 Scanning 하여 흡광도를 측정하였다.

표준 β-exotoxin분말(Pasteur Institute, Dr de Barjac)을 증류수에 용해하여 260㎚에서 측정한 것이 Fig. 2a에 제시되어 있고, ATP 분말을 증류수에 50μg과 100μg씩을 녹여서 정량적으로 260nm에서 측정한 것을 Fig. 2b에 나타냈다. β-exotoxin의 구조식이 ATP와 유사하여 이것도 표준으로 참고했다.

독성조사용액 준비

250mℓ의 삼각플라스크에 50mℓ의 Nutrient Broth에 Glucose (NBG) 1%를 넣고 BTK2를 접종한 후, 28℃ 항온기에서 12시간 배양한 균액에서 5mℓ을 취하여 500mℓ의 새로운 NBG에 접종하고 28℃ Water Bath Shaker (C-SWBI. 제일이화학기기 제작소)에서 48시간 진탕배양한 후 흰쥐와 흑염소 신장배양세포에 처리하였다. 48시간 균배양액을 Plate count방법에 의하여 산출된 균체수는 1.0×10^{6} cells/mℓ이었다.

흰쥐에 대한 독성조사

BTK2의 48시간 균배양액(β-exotoxin과 세균혼합)을 경구섭취, 복강내주사, 피하주사, 뇌내주사 등의 방법으로 투여하여 치사작용 유무를 조사하였다 (Table2). 실험군은 투여방법마다 흰쥐 10마리씩으로 하였으며, 투여량은 경구섭취의 경우 마실 수 있는 분량을 실험기간중 음료수 대신 매일 자유섭취하도록 하였고, 복강내주사 및 피하주사는 0.5mℓ씩을 비강접종 및 뇌내주사는 0.2~0.3mℓ씩을 주사하였다. 대조군에는 배양액을 투여하지 않았다. 각 실험군은 사육상에서 실온으로 4주간 사육되었다.

흑염소 신장배양세포에 대한 세포독성 조사

시험관에 Hank's Salt Solutson 0.9mℓ을 넣고 BTK2의 48시간 배양액 0.1mℓ를 ① 세포 배양과 동시 ② 세포층(Monolayer)이 형성된 후 (35℃에서 1시간 흡착)의 2가지 방법으로 접종하였고 배양액을 접종하지 않은 것을 대조용으로 하여 35℃에서 120시간 동안 세포에 대한 독성 여부를 관찰하였다.

결과 및 고찰

Bacillus thuringiensis 균주의 성장과 beta-exotoxin 생산력

B. thuringiensis K2을 정상형으로 하여 돌연변이 균체를 분리하였는데, *M. flava*의 배양 평판배지에 발육 억제환을 크게 형성하는 것을 골랐다.

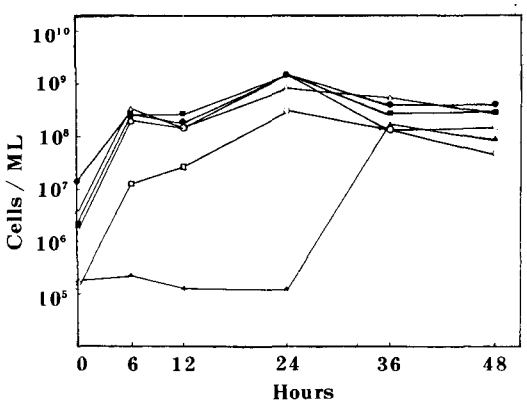

Fig.1. The viable cells of *Bacillus thuringiensis* SIK2 and its mutants cultured at 28℃. Symbols; (●) wild type, (▲) BTK2-T1, (■) BTK2-T13, (○) BTK2-T17, (△) BTK 2-T33, (□) BTK 2-T40.

돌연변이 체들의 환상의 크기가 3mm에서 5 mm로써 BTK2 균주보다 크게 나타났다. BTK2-T1은 5 mm로 정상형 BTK2의 2 mm에 비해서 2.5배였으며, BTK2-T13-T17과 -T40은 1.5배, 그리고 BTK2-T33은 4 mm로 2 배였다.

돌연변이 균주들의 성장곡선(Fig. 1)에서 보는 바와 같이 BTK2-T13,-T17과 T33은 BTK2 정상형과 유사하여 배지에 접종후 60분이 지나서 부터 대수 증식기에 들어 갔으나, BTK2-T40은 12시간, BTK2-T1은 24시간 후에 대수기에 접어들었다. BTK-2와 BTK2-T13, -T17, T33은 6시간 후 부터 계속 48시간 까지 Stationary stage을 유지하였고, 24시간째에 성장이 최고였으며 48시간 배양때에는 약간 줄어 들었다.

Beta-exotoxin은 adenine을 함유하고 있는 화합물로써 258nm 내지 260nm에서 최대의 흡광도를 나타낸다는 것이 보고되어 있으며[6,16,17,11] 본 연구에서도 이와 일치하는 결과를 얻었고 이 성격을 이용하여 beta-exotoxin의 양을 측정할 수 있

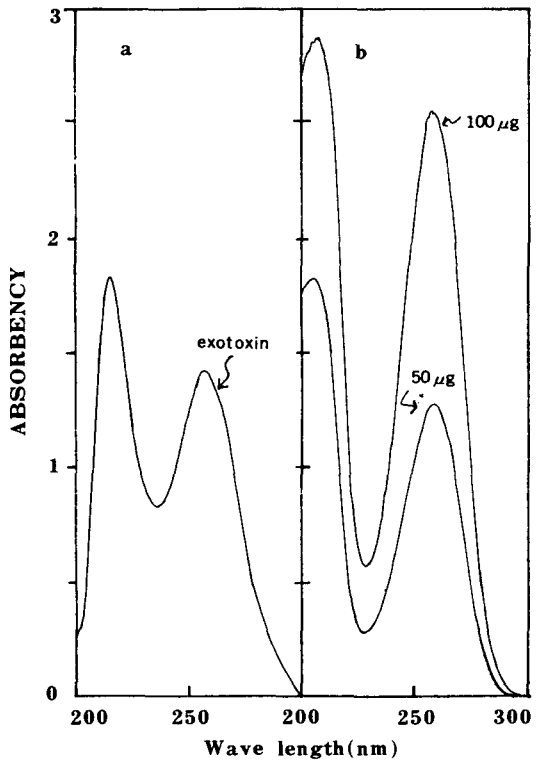

Fig 2. Standard Absorbency Curve of Beta-Exotoxin and ATP dissolved in distilled Water at the range of 200nm to 300nm. (2a) beta-exotoxin, and(2b) ATP.

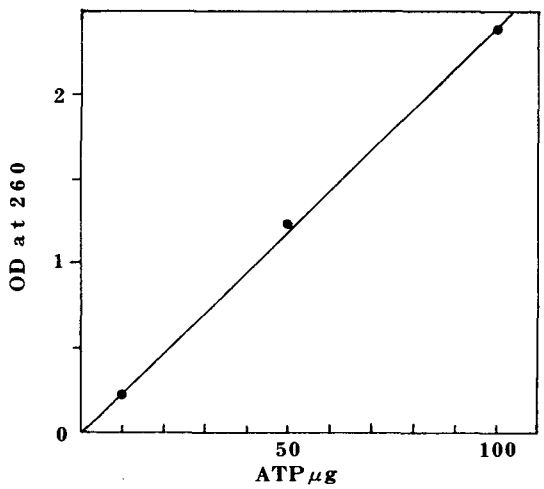

Fig 3. Standard Concentration Curve of ATP dissolved in Distilled Water at 260nm.

Table 1. The Comparison of the Amounts of Beta-Exotoxin produced by different *B. thuringiensis* strains cultured in Conner and Hansen Medium for 48 hours.

Strains	O. D. 260mm	No. of cells per mℓ	Relative amounts* per mℓ
K— 1	1.74	4.8×10^8	70
K -2	2.0	5.5×10^8	80
K -27	1.36	1.0×10^7	55
K -28	1.62	6.6×10^7	63
K -30	1.62	1.7×10^8	64
K -31	1.68	1.0×10^8	67
K -32	1.68	7.0×10^7	67
K -33	1.63	6.9×10^7	65
K -34	1.63	6.7×10^7	65
K -35	2.0	5.2×10^8	81
K -36	1.14	4.0×10^7	40
K -37	2.14	6.1×10^8	88
K2 - T1	1.90	9.8×10^7	77
K2 - T13	2.06	4.3×10^8	84
K2 - T17	2.12	1.4×10^8	87
K2 - T33	2.06	4.9×10^8	84
K2 - T40	1.60	6.5×10^7	63

* The amounts were measured by the Figure3.

었다 (Fig. 2와3).

Beta-exotoxin은 실험에 이용한 모든 균주에서 생산되었다. Table1에서 보는 바와 같이 48시간 배양에서 배양액 1㎖당 들어 있는 Beta-exotoxin의 양은 최저 40㎍에서 최고 88㎍이었다. 80㎍ 이상 분비한 균주는 BTK-2, K-35, K-37, BTK 2-T13, K2-T17, K2-T33이며 생균수도 모두 10^8 /㎖ 수준이였다. BTK2-36 균주는 균체수가 ㎖당 4×10^7세포이며 Beta-exotoxin 생산량은 제일 적게 나타났다.

BTK-2 돌연변이 균주 중 BTK2-T13,-T17 과 -T33은 모균주인 BTK-2에 비해서 비교적 생균수는 적어도 exotoxin의 생산량이 많게 나타났다. Fig. 4, 5, 6, 7, 8과 9에서 보는 바와 같이 Beta-exotoxin이 제일 많이 나타나는 시간을 BTK-2, BTK2-T13과 T-40은 24시간 배양시에, BTK2-T17과 -T33은 36시간, BTK2-T13과 T40은 24시간 배양시에 BTK2-T17과 -T33은 36시간, BTK 2-T1은 48시간에 최대생산을 나타냈다. Fig. 10에서는 6시간 배양액에서 Beta-exotoxin의 양이 제일 많이 분비하는 균주는 BTK-2이고, BTK2-T1은 거의 생산을 않했으며, BTK2-T40은 Beta-exotoxin의 생산이 BTK-2의 중간 정도였다. Fig. 11에서는 12시간 배양인데도 BTK2-T1은 생산을 않했고 BTK2-T40은 역시 BTK-2의 중간이고 돌연변이 균주 BTK2-T13과 -T17이 BTK-2 보다 Beta-exotoxin 생산을 더욱 많이 했다. 24시간 배양에서는 BTK2-T1을 제외하고는 O. D. 260 nm에서 2.0이상을 생산했다. 36시간 배양에서는 24시간과 같으나 BTK2-T1이 O. D. 0.5정도의 Beta-exotoxin 생산을 했고, 48시간에서는 BTK2-T1은 BTK-2와 똑같은 양을 생산했다.

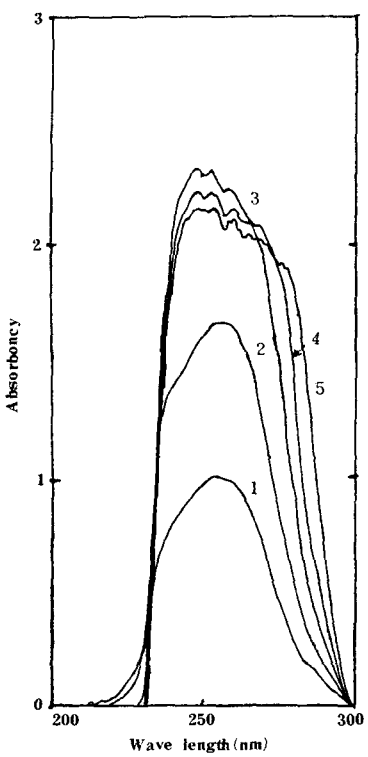

Fig. 4.
The productivity of exotoxin from *Bacillus thuringiensis* S1K2. The bacterium was cultured in Conner and Hansen medium.
No. 1. indicates 6hour culture;
No. 2. 12hours; No. 3, 24 hours;
No. 4, 36 hours; No. 5, 48 hours;

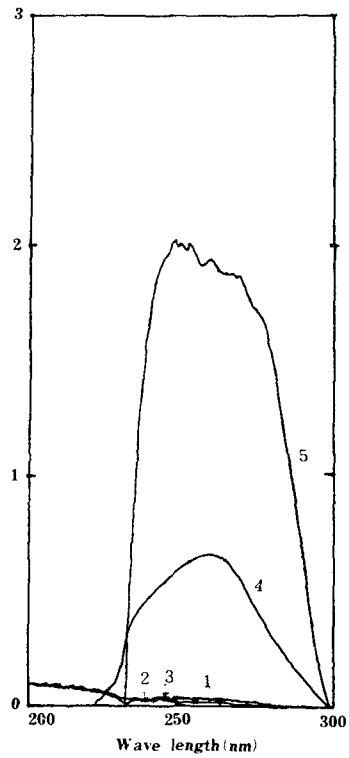

Fig. 5.
The productivity of exotoxin from *Bacillus thuringiensis* K2-T2 The bacterium was cultured in Connor and Hanson medium.
No. 1, indicates 6hour culture;
No. 2, 12hours; No. 3, 24hours;
No. 4, 36hours; No. 5, 48hours.

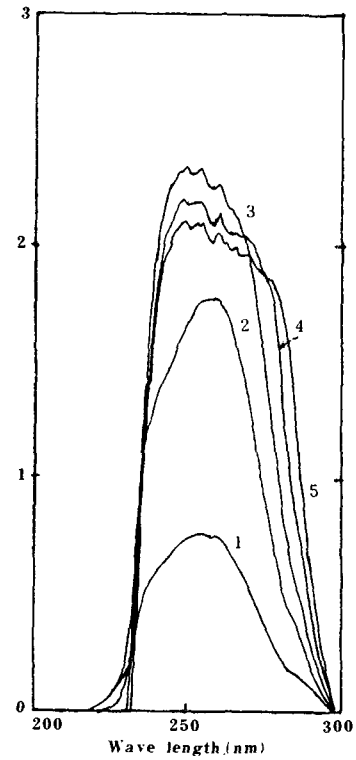

Fig. 6.
The productivity of exotoxin from *Bacillus thuringiensis* K2. T13 The bacterium was cultured in Conner and Hansen medium.
No. 1. indicates 6hour culture;
No. 2. 12hours; No. 3, 24 hours;
No. 4, 36 hours; No. 5, 48 hours;

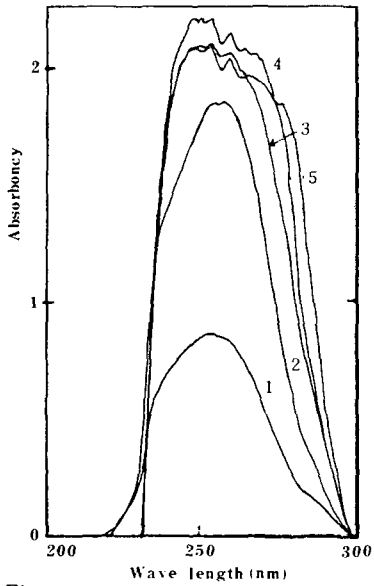

Fig. 7.

The productivity of exotoxin from *Bacillus thuringienis* K2-T17 The bacterium was cultured in Connor and Hanson medium.

No. 1, indicates 6hour culture;
No. 2, 12hours; No. 3, 24hours;
No. 4, 36hours; No. 5, 48hours.

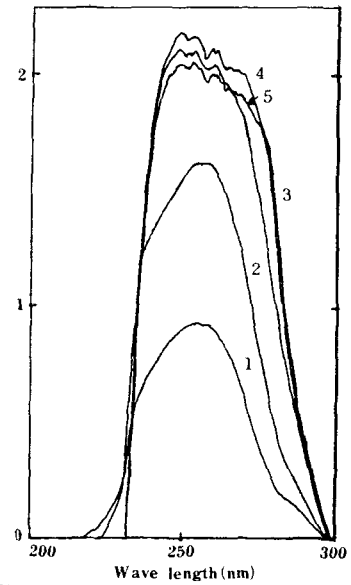

Fig. 8.

The productivity of exotoxin from *Bacilus thuringiensis* K2-T33. The bacterium was cultured in Conner and Hansen medium.

No. 1. indicates 6hour culture;
No. 2. 12hours; No. 3, 24 hours;
No. 4, 36 hours; No. 5, 48 hours;

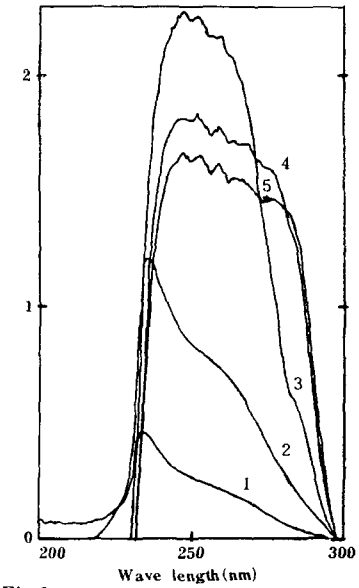

Fig. 9.

The productivity of exotoxin from *Bacillus thuringienis* K2-T40. The bacterium was cultured in Connor and Hanson medium.

No. 1, indicates 6hour culture;
No. 2, 12hours; No. 3, 24hours;
No. 4, 36hours; No. 5, 48hours.

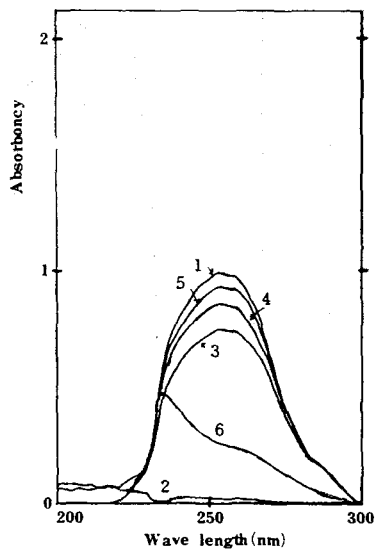

Fig. 10. The comparison of the productivity of exotoxin from *Bactllus thuringinensis* SIK2. and its mutants after 6 hour culture in Conner and Hansen medium.

No. 1. wild type
No. 2. BTK2-11
No. 3. BTK2-T13
No. 4. BTK2-T17
No. 5. BTK2-T33
No. 6. BTK2-T40

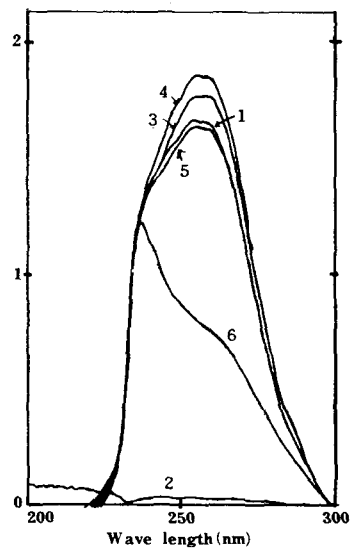

Fig. 11. The comparison of the productivity of exotoxin from *Bactllus thuringinensis* SIK2. and its mutants after 12 hour culture in Conner and Hansen medium.

No. 1. wild type
No. 2. BTK2-11
No. 3. BTK2-T13
No. 4. BTK2-T17
No. 5. BTK2-T33
No. 6. BTK2-T40

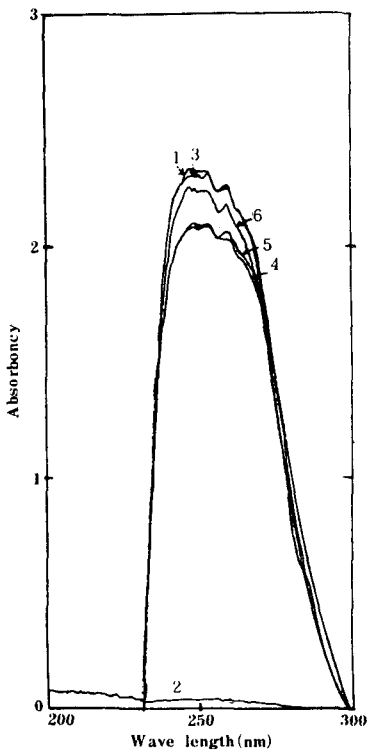

Fig. 12.
The comparison of the productivity of exototoxin from *Bactllus thuringinensis* S1K2 and its mutants after 24 hour culture in conner and Hansen medium.
No. 1. wild type
No. 2. BTK2-11
No. 3. BTK2-T13
No. 4. BTK2-T17
No. 5. BTK2-T33
No. 6. BTK2-T40

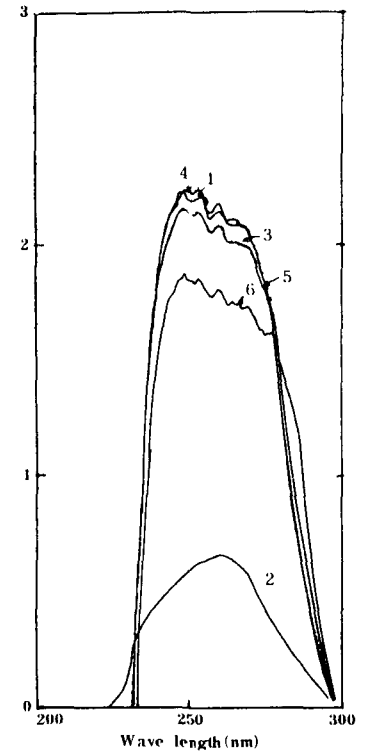

Fig. 13.
The comparison of the productivity of exototoxin from *Bactllus thuringinensis* S1K2 and its mutants after 36 hour culture in conner and Hansen medium.
No. 1. wild type
No. 2. BTK2-11
No. 3. BTK2-T13
No. 4. BTK2-T17
No. 5. BTK2-T33
No. 6. BTK2-T40

Fig. 14.
The comparison of the productivity of exototoxin from *Bactllus thuringinensis* S1K2 and its mutants after 48 hour culture in conner and Hansen medium.
No. 1. wild type
No. 2. BTK2-11
No. 3. BTK2-T13
No. 4. BTK2-T17
No. 5. BTK2-T33
No. 6. BTK2-T40

Fig. 15a, b와 c는 BTK-2 이외의 다른 Serotypes들의 Beta-exotoxin의 생산력에 대한 도표이다. 모든 균주들이 Beta-exotoxin 생산능력을 가지고 있고, 균주에 따라서 생산량에 차이가 있었다.

BTK-1, K-30, K-31, K-32, K-33과 K-34는 거의 같은 수준의 exotoxin량을 나타냈으나, BTK-35와 K-37이 최고로 높은 수준을 생산했고, BTK-27과 K-36은 K-37의 절반 정도였다. (Table 1).

ATP양에 대한 비례도는 BTK-37은 88μg/mℓ, BTK-36은 40μg/mℓ을 생산했다.

흰쥐에 미치는 독성효과

Table 2에 나타난 바와 같이 경구 섭취 및 피하주사의 경우 독성효과를 확인할만한 결과는 나타나지 않았으며, 복강내주사, 비강접종, 뇌내주사

Table 2. Toxic Effects of the Cultured Media of *Bacillus thuringiensis* K2 on Mice.

Treated method	Dose (mℓ)	No. of mouse treated	No. of death in 4 weeks	No. of survivor
Per os	0.5	10	0	10
intraperitoneal injection	0.5	10	0	10
subcutaneous injection	0.5	10	0	10
nasal cavity inoculation	0.2 0.3	10	0	10
intracerebral injection	0.2-0.3	10	0	10
control	water	10	0	10

*means no death.

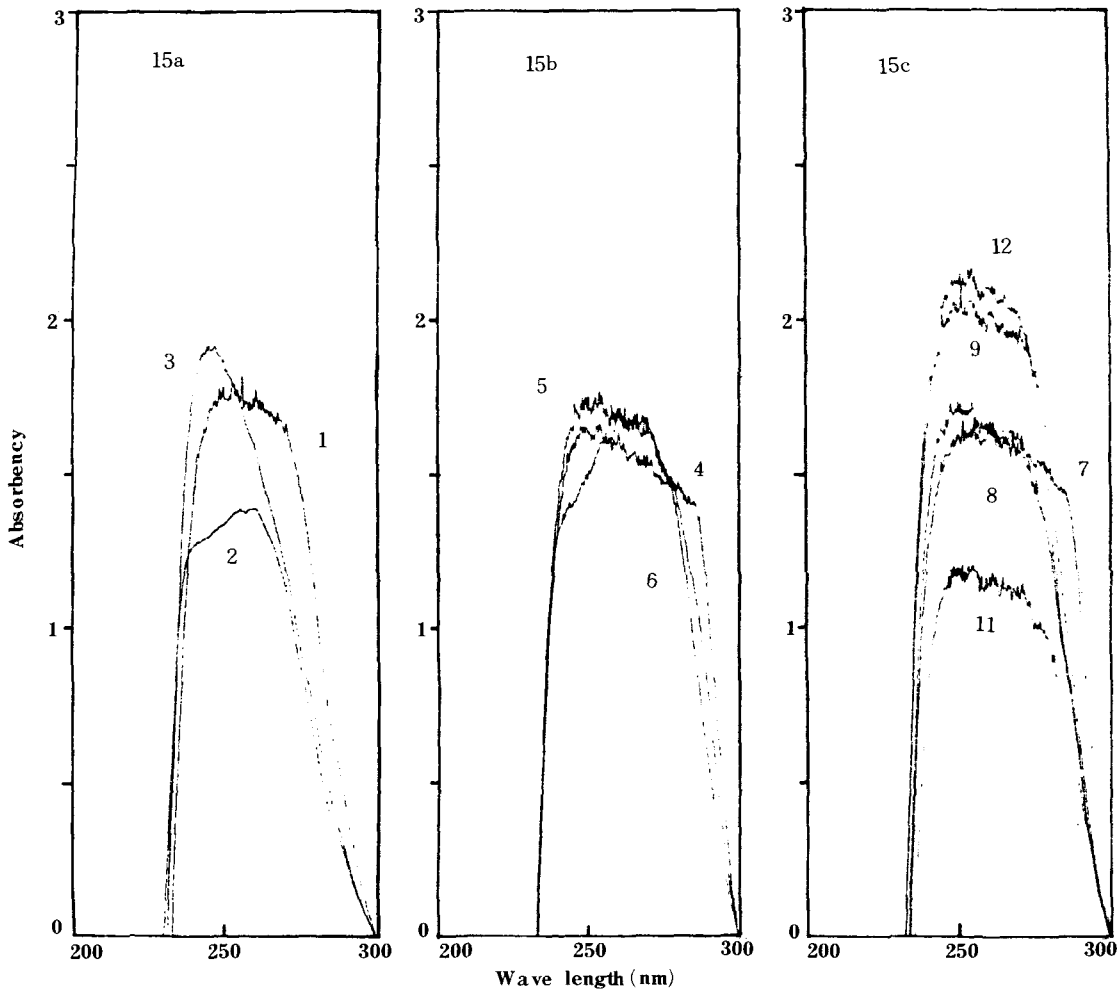

Fig. 15. The productivity of exotoxin from different serotypes of *Bacillus thuringiensis*

(15a) 1=K-1, 2=K-27, 3=K-28; (15b) 5=K-30, 6=K-31, 4=K-32; (15c) 7=K-33, 8=K-34, 9=K-35, 11=K-36, 12=K-37

의 경우도 모두 건강하여 대조군과 비교할때 독성효과를 인정할 수 없었다. Beta-exotoxin 만을 쥐에 처리했을 때에는 전혀 쥐에게 해를 주지 않은 유사한 보고[14]가 있고, 또한 쥐를 치사시킨다는 보고[15]가 있었으나, 본 연구에서는 전혀 독성효과가 없었다.

흑염소 신장배양세포에 대한 세포독성

흑염소 신장배양 세포에 대한 세포독성 유무를 광학현미경 및 육안으로 관찰한 바 세포배양 과동시 접종, 세포층 형성한 후 접종의 어느쪽도 대조용과 비교하여 세포에 독성효과가 나타나지 않았다.

요 약

Bacillus thuringiensis 16개 균주에서 Beta-exotoxin 생산을 연구하였다. 균주는 Conner-Hansen Mineral Salts 배지에 시험균을 접종하여 28℃에서 진탕배양을 한 후 *Micrococcus flava* 을 이용하여 감수성과 생산능을 조사했고, Spectrophotometer를 이용하여 260㎚에서 생산량과 생산속도 등을 조사했다.

1. *Bacillus thuringiensis*의 돌연변이 균주 BTK2-T1, BTK2-T13, BTK2-T17, BTK2-T33과 BTK2-T40은 Conner-Hansen 배지에서 배양 6시간 부터 Stationary Phase에 접어들어 가서 48시간 배양과 별 차이를 나타내지 않았으나, Bata-exotoxin의 생산은 6시간 배양에서는 O.D. 260㎚에서 약 1.0미만(약40μg/㎖)이였고, 12시간

배양에서는 O.D. 260nm에서 약 1.7미만(약 70μg/mℓ)이었으며, 24시간배양 부터 48시간 배양에서는 거의 증가를 보이지 않고, O.D. 260nm에서 2.0 내지 2.3(약 85μg/mℓ)을 계속 유지했다.

48시간 배양균주들은 BTK2는 배지 mℓ당 80μg (5.5×10^8 Cells/mℓ), BTK2-T13은 84μg(4.3×10^8 Cells/mℓ), BTK2-T17은 87μg(1.4×10^8 Cells/mℓ), 그리고 BTK2-T33은 84μg(4.9×10^8 Cells/mℓ)을 분비했다.

2. 다른 혈청형 균주들도 모두 Beta-exotoxin을 생산했는데, 48시간 배양 배지 mℓ당 70μg 을 분비한 균주는 BTK-1 이고, BTK-37 균주는 mℓ당 88μg(6.1×10^8 Cells/mℓ), BTK-35 균주는 mℓ당 81μg(5.2×10^8 Cells/mℓ)을 생산했고, 그외는 모두 70μg미만이었다.

3. Beta-exotoxin과 *B. thuringiensis* 균체을 동시에 per os, interaperitoneal injection, subcuntaneous injection, nasal cavity inoculation, intracerebral injection을 120시간 처리했어도 치사효과를 나타내지 않았다.

사 사

본 연구는 아산재단의 학술연구비 지원으로 수행되었으며, 이를 감사드립니다.

참고문헌

1. Mac Connel, E. and A. G. Richards. *Can. J. Microbiol.* **5**, 161 (1959)
2. Burgerion, A. and H. de Bar ac. C. R. *Acad. Sci.* Paris (Serie D), **251**, 911 (1960)
3. Hall, I. M. and K. Y. Arakawa. *J. Insect Pathol.* **1**, 351 (1959)
4. Dunn, P. H. J. Insect Pathol. **2**, 13 (1960)
5. de Earjac, H. and Dedonder. *Bull. Soc. Chim. Chiol.* **50**, 941 (1958) 6
6. Benz, G. J. Invertebr. *Pathol.* **6**, 381 (1966)
7. Farkas, J., Sebesta, K. Horkas, K., Samek, Z., Dolijs, J. and F. Sorm. Coll. *Czech. Chem. Comm.* **34**, 1118 (1969)
8. Prasad, S. S. V., Tilak, K. B. R. and K. G. Gollakota. *J. Invertebr. Pathol.* **20**, 377 (1972)
9. Krieg, A. J. Invertebr. *Pathol.* **12**, 478 (1968)
10. Hall, I. Y., Hunter, D. K. and K. Y. Arakawa. 1971. *J. Invertebr. Pathol.* **18**, 359 (1971)
11. Carlber, G. Ph. D. *Thesis. University of Helsinki.* (1973)
12. Conner, R. M. and P. A. Hansen. *J.* Invertebr. *P Pathol.* **9**, 114. (1967))
13. Balows, A. *NCCLS. ASM*-2, 1 (1976)
14. Lee, H. H. J. Science, *Kon Kuk University*, Seoul. **26**, 53 (1982)
15. Sebesta, K., Horska, K. and J. Vanokova. Auct *Colln. Czeh. Chem. Commun.* **34**, 1789 (1969)
16. Bond, R. P. M., Boyce, C. B. C. and S. J. *French. Biochem. J.* **114**, **477** (1969) 477
17. Kim, Y. T3and H. T. Huang. *J. Invertebr. Pathol.* **15**, 100 (1970)